

## تأثیر عصاره های چای سیاه و سبز بر تشکیل بیوفیلم استرپتوکوک های ایجاد کننده پلاک دندانی

کسری حمیدی\*، علیرضا شعاع حسینی\*\*، نگار اردوزاده\*، امیر قائمی\*\*\*<sup>۱</sup>

\*کارشناس ارشد. میکروبیولوژی- عضو باشگاه پژوهشگران جوان- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، \*\*دانشجوی PhD میکروبیولوژی - عضو باشگاه پژوهشگران جوان - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، \*\*\*مربی گروه میکروبیولوژی -دانشگاه علوم پزشکی گرگان - عضو باشگاه پژوهشگران جوان- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲۹ تاریخ تایید: ۸۷/۶/۳

### چکیده:

زمینه و هدف: چای از پر مصرف ترین نوشیدنی ها در ایران است. اثرات ضد میکربی چای روی میکروارگانیسم های متعددی به اثبات رسیده است و یافتن فرآورده های طبیعی مانند مشتقات چای، که فاقد مخاطرات بر سلامت انسان باشند جهت کاهش ارگانیسم های پاتوژن ضروری بنظر می رسد. لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر عصاره چای سیاه و سبز ایرانی بر استرپتوکوک های دهانی (استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس میتیس و استرپتوکوکوس سنگویس) و اثر بازدارندگی آنها از تشکیل بیوفیلم، روی عوامل ایجاد کننده پلاک های دندانی و پوسیدگی دندان انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پس از عصاره گیری نمونه ها با حلال متانول ۵۰٪ و جدا نمودن مجدد در فاز اتیل استات، عصاره ها توسط فیلتر ۰/۴۴ میکرون استریل شده و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. از روش تهیه رقت های متوالی در محیط مایع برای محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی و با تلقیح باکتری ها به درون ارلن های حاوی لام های شیشه ای برای سنجش تشکیل بیوفیلم استفاده شد. تشکیل بیوفیلم با کشت نمونه از روی لام ها و شمارش کلنی ها و همچنین مقایسه آنها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با نمونه شاهد (محیط های تیمار نشده) مقایسه گردید. میانگین اندازه گیری ها در سه بار تکرار بیان و خطاها در هر نمونه با استفاده از آزمون آماری استاندارد (ANOVA) تعیین گردید.

یافته ها: میکروسکوپ فاز کنتراست کاهش فوق العاده ای را در چسبیدن میکروارگانیسم های تیمار شده به یکدیگر در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد. در غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره چای سیاه بیوفیلم تشکیل نشد و غلظت ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره چای سبز نیز بازدارنده کامل تشکیل بیوفیلم بود. عصاره های چای سیاه و سبز، به ترتیب در غلظت ۲/۵ و ۳ میلی گرم در میلی لیتر اثر باکتری سایدی روی استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس میتیس و استرپتوکوکوس سنگویس داشتند.

نتیجه گیری: عصاره های چای به هر دو صورت چای سیاه و سبز خاصیت باکتری سایدی داشتند و اثر ضد میکربی چای سیاه بر روی استرپتوکوک های دهانی و ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط آنها بیشتر از چای سبز است.

واژه های کلیدی: استرپتوکوک های دهانی، بیوفیلم، پلاک دندانی، کاملیا سیننسیس، عصاره چای.

### مقدمه:

پلیمری مانند تیافلاوین و تیارویجین است، غیر فعال شود (۱). چای سبز کمترین تخمیر را پیدا کرده و دارای مقادیر فراوانی از کاتچین ها می باشد که از نظر شیمیایی به عنوان فلاوان تربول شناخته می شوند. اگر به آنزیم پلی فنل اکسیداز اجازه فعالیت بیشتری داده شود و درجه حرارت تخمیر هم افزایش پیدا کند خصوصیات بو و رنگ چای سیاه حاصل می شود (۲). چای سبز غنی

چای از عمده ترین نوشیدنی های مصرفی در ایران می باشد. گیاه چای، بومی جنوب شرقی آسیا بوده و چای از برگ های جوان گیاه *Camellia sinensis* تهیه می شود. برای تهیه چای سبز، جوانه های چای بلافاصله پس از برداشت، تحت حرارت و مالش قرار گرفته تا آنزیم پلی فنل اکسیدازی که قادر به اکسید کردن کاتچین های چای به مشتقات الگومری و

<sup>۱</sup>نویسنده مسئول: گرگان- کیلومتر ۵ جاده ساری - دانشگاه علوم پزشکی گرگان- ساختمان فلسفی - گروه میکروبیولوژی- تلفن: ۰۹۱۲۲۵۴۹۹۱۶

E-mail: ghaemi\_amir@yahoo.com

از مواد آنتی اکسیدان، ضد التهاب و ضد سرطان است (۳) که باعث افزایش بیان آنتی اکسیدان‌های درون سلولی مانند گلوکاتایون، گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کینون ردوکتاز می‌شود (۴). چای سبز حاوی پلی فنل‌ها، کافئین، فلاوونول‌ها (کرسٹین، کمپفرول و روتین)، تانین و ترکیبات معطر است (۵). بطور کلی پلی فنل‌های گیاهی ترکیباتی سمی هستند که می‌توانند پروتئین‌ها را رسوب دهند (۶). گزارشات ضد و نقیضی از اثر ضد باکتریایی چای روی برخی از گونه‌های باکتری‌ها وجود دارد بعنوان مثال Hara و Ishigami گزارش دادند که *سالمونلا تایفی* موریوم و *کمپیلوباکتر جیجونی* به چای مقاومند (۷) ولی بسیاری دیگر *سالمونلا تایفی* موریوم را حساس به چای گزارش نمودند (۸)، Toda و همکارانش *کمپیلوباکتر* را نیز حساس یافتند (۹). همچنین آنها گزارش نمودند که غلظت‌هایی از چای موجود در یک فنجان (۳ میلی گرم در میلی لیتر) قادر به از بین بردن *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین است (۱۰). دانشمندان دیگری نشان دادند که پلی فنل‌های برگ سبز چای اثر مہاری بر رشد *اشرشیا کلی*، *استرپتوکوکوس پایوجنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (۱۱). یافته‌ی مشابهی هم در مورد *بوردتلا پرتوسیس* (۱۲) و *لیستریا مونوسیتوجنز* ثابت گردید (۱۳). همچنین محققان ثابت نمودند که عصاره‌های چای بر ضد گونه‌های *کلاستریدیوم*، باکتری‌های بیماریزای گیاهی مانند *اروینیا* و همچنین گونه‌های *سودوموناس* فعال می‌باشند (۱۴). در سال ۲۰۰۴ محققان دریافتند که پلی فنل‌های چای قادر به مهار *استرپتوکوکوس موتانس* می‌باشد (۱۵). همچنین اپی گالوکاتچین موجود در چای فعالیت تتراسایکلین را بر روی *استافیلوکوک*‌ها افزایش می‌دهد (۱۶). اثر سینرژیستی عصاره‌ی چای سبز و پروبیوتیک‌ها بر روی باکتری‌های بیماریزایی مانند *استافیلوکوک اورئوس* و *استرپتوکوک پایوجنز* نشان داده شده است (۱۷).

بصورت زنجیره‌های کوتاه رشد می‌کنند و در محیط‌های دارای سوکروز به دلیل تولید دکستران و لوان حالت ژله‌ای ایجاد می‌کنند. این باکتری‌های کامنسال تا ۶۰ درصد فلور طبیعی سطوح درون دهان را تشکیل می‌دهند که می‌توانند در هنگام خراش مخاط دهان، کشیدن دندان و جراحی لوزه‌ها وارد جریان خون شده و با کلونیزاسیون، یک نوع اندوکاردیت تحت حاد بنام بیماری اوسلر ایجاد کنند. این باکتری‌ها با تولید مواد پلیمری چسبناک و غیر محلول مانند گلوکان و لوان باعث تشکیل بیوفیلم بر سطح مینای دندان شده و با تخمیر مواد قندی مقدار زیادی اسید تولید می‌کنند که اسید حاصله باعث حل شدن مواد معدنی سطح مینای دندان و ایجاد پلاک‌های دندانی شده و به این صورت پوسیدگی دندان حاصل می‌شود (۱۸).

اثرات ضد میکربی چای، بخصوص چای سبز در مطالعات متعددی نشان داده شده است ولی ارزیابی اثرات مہاری چای بر روی بیوفیلم *استرپتوکوک*‌های دهانی که نقش مهمی در ایجاد پلاک‌های دندانی دارند صورت نگرفته است همچنین یافتن فرآورده‌های طبیعی بخصوص مشتقات گیاهی، که فاقد عوارض و مخاطرات برای سلامت انسان باشند جهت کاهش جمعیت ارگانیسم‌های بیماریزا به خصوص بیوفیلم حاصل از آنها که نقش عمده‌ای در مقاومت به عوامل محیطی و مواد ضد میکربی دارد ضروری بنظر می‌رسد. لذا این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی اثر عصاره‌های چای سیاه و سبز بر *استرپتوکوک*‌های دهانی (*استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس میتیس* و *استرپتوکوکوس سنگویس*) و اثر بازدارندگی آنها از تشکیل بیوفیلم روی عوامل ایجاد کننده پلاک‌های دندانی و پوسیدگی دندان انجام شد.

### روش بررسی:

بررسی حاضر تحقیقی تجربی می‌باشد. مواد اصلی مورد استفاده در این پژوهش، چای سبز و چای سیاه (*Camellia sinensis* L) درجه یک فاقد هرگونه

اسانس و افزودنی بودند که از یک کارخانه چای سازی شهرستان لاهیجان، واقع در شمال ایران خریداری شدند و جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه میکروبیولوژی مجتمع آزمایشگاهی علوم و تحقیقات تهران منتقل گردیدند.

**عصاره گیری:** ۱۰ گرم از هر نمونه چای سبز و سیاه پس از آسیاب شدن، در ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط ۵۰ درصدی آب و متانول، توسط عصاره گیر Soxhlet عصاره گیری شدند، سپس این عصاره ها وارد فاز اتیل استات شدند تا اجزای پلی فنلی آن کاملاً وارد اتیل استات گردد و عصاره ها پس از فیلتر شدن توسط فیلتر ۰/۴۴ میکرون تا زمان استفاده در یک فائل استریل در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۹).

**میکروارگانیزم ها:** جهت بررسی اثر ضد میکربی عصاره ها و تاثیر آنها بر تشکیل بیوفیلم، سویه های استاندارد استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 25175)/ استرپتوکوکوس میتیس (ATCC 9811) و استرپتوکوکوس سنگویس (ATCC 10556) تهیه شده از بانک میکربی مرکز تحقیقات ایران، مورد آزمایش قرار گرفتند.

#### تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration):

برای کشت اولیه سویه ها از محیط BHIB (Brain heart infusion broth) (مرک، آلمان) استفاده شد. جهت تشکیل بیوفیلم از همین محیط در ارلن مایر و برای ارزیابی قابلیت ضد میکربی عصاره ها از رقت های مختلف عصاره ها در محیط مولر هیتون براث (دیفکو، فرانسه) به اضافه ۵٪ خون دفیبرینه گوسفند، استفاده گردید (طبق استاندارد ملی ارزیابی حساسیت ضد میکربی، NHS (National public health service of wales= (۲۰).

**مقایسه اثر ضد میکربی:** برای سنجش و مقایسه اثر ضد میکربی عصاره های چای سیاه و سبز، از روش انتشار چاهک استفاده شد (۲۰). چاهک هایی با قطر ۵ میلیمتر روی پلیت های مولر هیتون آگار ایجاد شد و به ۳۰ میکرولیتر از عصاره های ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر چای سبز و سیاه آغشته شد. از کشت ۸ ساعته ۳ گونه از استرپتوکوک های دهانی مورد نظر در BHIB، به کمک

اسپکتروفتومتر Shimadzo UV 120-01 سوسپانسیون هایی با  $OD_{600}=1$ ، ساخته شد و از آن بر روی پلیت های مولر هیتون آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند، توسط سواب، کشت پر داده شد و تا حصول نتیجه به مدت ۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری گردید. برای کنترل مثبت از پنی سیلین ۱۰  $\mu\text{g}$  و به عنوان کنترل منفی از سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. مقایسه حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره ها با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک نمونه مورد نظر تعیین گردید. **بررسی تشکیل بیوفیلم:** جهت بررسی اثر عصاره های چای سیاه و سبز بر تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس میتیس و استرپتوکوکوس سنگویس از روش تهیه رقت در محیط مایع استفاده شد. به این صورت که از کشت ۱۸ ساعته میکروارگانیزم های مورد نظر در BHIB، به کمک اسپکتروفتومتر Shimadzo UV 120-01 سوسپانسیون هایی با  $OD_{600}=1$ ، ساخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون های هر کدام از باکتری ها به ۱۶ ارلن مایر حاوی لام های شیشه ای استریل تلقیح شد که به ترتیب حاوی ۰، ۱/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره های چای سیاه و سبز در BHIB بودند. این ارلن ها در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند و بطور روزانه به مدت دو هفته جهت رویت بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه برداری از سطح لام های موجود در ارلن ها برای شمارش باکتریهای متصل به آنها پس از کشت نمونه روی BHIA (Brain heart infusion agar) صورت گرفت، همچنین با برداشتن روزانه ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های تیمار شده با عصاره های چای سیاه و چای سبز، قابلیت چسبیدن باکتری ها به یکدیگر، روی لام در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی قرار گرفت. تمام اطلاعات بر اساس سه بار تکرار در هر مرحله آزمایش ارائه گردید و میانگین اندازه گیری ها در سه تکرار بیان شد. از کشت باکتری ها در محیط های تیمار نشده به عنوان شاهد استفاده شد و خطاها در هر نمونه با استفاده از روش آماری استاندارد ( $p \leq 0/05$  ANOVA) تعیین گردید.

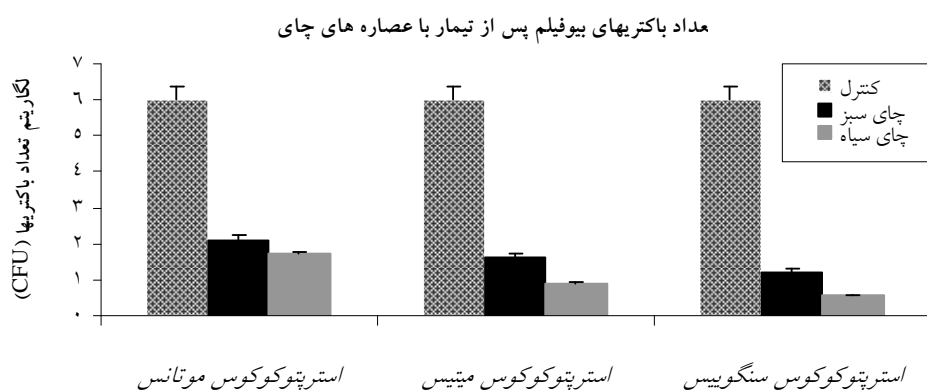
## یافته ها:

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره های چای سیاه و سبز در غلظت ۳ میلی گرم در میلی لیتر به این صورت بود که برای عصاره چای سیاه قطر منطقه مهار رشد *استرپتوکوکوس موتانس* ۲۵/۵ میلیتر، *استرپتوکوکوس میتیس* ۲۸ میلیتر و *استرپتوکوکوس سنگویس* هم ۲۹ میلیتر بود. در همین غلظت از عصاره چای سبز ناحیه ممانعت از رشد برای *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس میتیس* و *استرپتوکوکوس سنگویس* به ترتیب ۲۴، ۲۶/۵ و ۲۷ میلیتر بود. این مقادیر، از نظر فعالیت ضد باکتریایی در مقایسه با نمونه کنترل مثبت یعنی پنی سیلین که هاله های عدم رشدی به اندازه ۳۳ میلیتر در *استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سنگویس* و ۳۴ میلیتر در *استرپتوکوکوس میتیس* ایجاد می کند، قابل ملاحظه است ( $P < 0.05$ ).

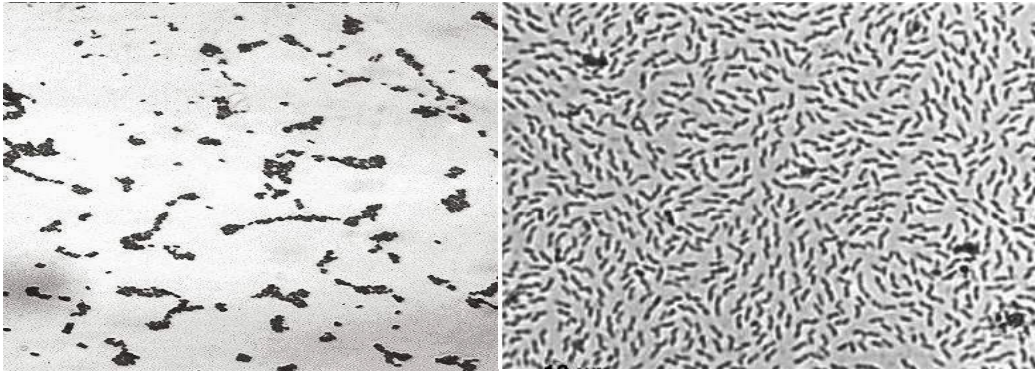
در بررسی ارلن های تلقیح شده با این میکروارگانیسم ها، تشکیل بیوفیلم بر جداره داخلی ارلن و لام های شیشه ای درون ارلن های حاوی *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس میتیس* و *استرپتوکوکوس سنگویس* پس از ۱۸ ساعت کاملاً واضح بود. در روز چهارم در تمام ارلن های حاوی ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره های چای سبز و سیاه تشکیل بیوفیلم به وضوح

دیده شد. در ارلن های حاوی غلظت ۱ میلی گرم از عصاره چای سبز، در روز هفتم تشکیل بیوفیلم مشهود بود ولی در مورد ارلن های حاوی ۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره چای سیاه، بیوفیلم دیده نشد. غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره چای سیاه و ۳ میلی گرم در میلی لیتر عصاره چای سبز اثر بازدارندگی کامل بر رشد باکتری ها داشتند. تعداد باکتری های جدا شده از بیوفیلم پس از تیمار با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت عصاره های چای سیاه به طور معنی داری کمتر از چای سبز بود ( $P < 0.01$ ) (نمودار شمار ۱).

با بررسی میکروسکوپی نمونه های برداشت شده از همین ارلن ها و مشاهده آنها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، معلوم شد که باکتری های تیمار نشده، روی لام قادر به چسبیدن و اتصال به یکدیگر و تشکیل توده بودند (تصویر شماره ۱) ولی باکتری های تیمار شده در غلظت های بالاتر از ۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره های چای سیاه و ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر از چای سبز، دیگر قادر به تشکیل کلامپ و اتصال به یکدیگر نبودند و از اینرو تشکیل بیوفیلم روی جدار ارلن مایر نیز توسط این باکتری ها با موفقیت انجام نشد (تصویر شماره ۱).



**نمودار شماره ۱:** تعداد باکتری های بازایی شده از بیوفیلم *استرپتوکوک* های تیمار شده با ۱ میلی گرم در میلی لیتر عصاره های چای پس از ۲۴ ساعت. -  $P < 0.01$  بین چای سبز و سیاه در هر سه گونه.



**تصویر شماره ۱:** تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست از بهم چسبیدن باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* بر روی لام. - نمونه تیمار نشده (شکل سمت راست) و نمونه تیمار شده با ۱ میلی گرم در میلی لیتر عصاره چای سیاه (شکل سمت چپ).

## بحث:

تیافلاوین مانند کاتچین‌ها بوده و دارای خاصیت ضد میکربی قدرتمندی می باشد.

اجزای فرار طعم دهنده چای نیز که به مقدار کمی وجود دارند (۱۰ تا ۲۰ ppm)، دارای خاصیت ضد میکربی هستند و چون این اجزا در چای سیاه بسیار بیشتر از چای سبز وجود دارند (۵) از این رو یکی از عوامل بازدارندگی بیشتر چای سیاه را می توان اثر این عناصر طعم دار دانست که وفور آن در چای سیاه باعث قدرت ممانعت کنندگی بیشتری روی *استرپتوکوک* های دهانی می گردد.

Lin و همکارانش حدود ۳۰۰ نوع از این عناصر طعم دهنده فرار را در چای سیاه (۲۴) و Kubo و همکارانش نزدیک به ۱۰۰ نوع از این اجزاء را در چای سبز یافته بودند (۲۵).

Graham در مطالعه مروری خود اشاره کرده که مطالعات اپیدمیولوژی Cao و همکاران و Onisi و همکاران نشان داده که در جمعیت کودکان مدرسه ای که چای زیاد می نوشند، درصد پوسیدگی دندان بسیار کمتر از جمعیت هایی است که چای کمتر می نوشند (۲۶). پیشنهاد شده بود که اثر چای در حفاظت از پوسیدگی دندان به دلیل جذب بیشتر فلوراید در اثر مصرف چای می باشد (۲۷) که البته این امر صحیح بنظر نمی رسد چون Brandao و همکارانش نشان دادند که

پژوهش ما کاربرد چای، این نوشیدنی پر مصرف را به هر دو صورت چای سیاه و سبز، جهت مهار باکتری های دهانی و همچنین ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط آنها را تایید می کند و نشان می دهد که غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره متانولی - اتیل استاتی چای سیاه و ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره چای سبز باعث توقف تشکیل بیوفیلم توسط *استرپتوکوک* های دهانی می گردد. غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره چای سیاه و ۳ میلی گرم در میلی لیتر عصاره چای سبز نیز باکتری ساید بوده و باعث مرگ این *استرپتوکوک* ها می گردد. مطالعات Hsu و همکاران نشان داد که پس از مصرف چای، غلظت ترکیبات پلی فنی در بزاق انسان بسیار بیشتر از غلظت آن در پلاسمای خون می باشد (۲۱).

بررسی ما قدرت ضد *استرپتوکوک*ی بیشتری را در چای سیاه که منبع بیشتری از تیافلاوین، تیاروبیجین و بطور کل آیزوفلاوان های اکسید شده می باشد نسبت به چای سبز که غنی از کاتچین هاست، نشان داد. این موضوع ثابت می کند که تیافلاوین قابلیت نفوذ بیشتری در *استرپتوکوک* ها نسبت به کاتچین ها دارد و جذب بالاتر تیافلاوین ها دارای اثر مستقیم بر رشد این گروه از باکتری ها می باشد. Hattori و همکاران (۲۲) و همچنین Fukai و همکاران (۲۳) گزارش کردند که فعالیت

مصرف چای سبز نسبت به مصرف فلوراید دارای اثر بهتری در جلوگیری از پوسیدگی های دندان است (۲۸). Hirasawa و همکارانش نشان دادند که رساندن موضعی پلی فتل های چای سبز به دهان باعث بهبود بیماری لثه و عفونت آن می شود (۲۹).

مطالعه دیگری نشان داده بود که اپی گالوکاتچین گالات باعث غیر فعال شدن آنزیم آمیلاز در بزاق شده و نشاسته کمتری در دهان هیدرولیز می شود و بدین ترتیب خوردگی مینای دندان کاهش می یابد (۳۰). از طرفی مطالعه ما نشان داد که مصرف چای باعث کاهش کلونیزاسیون استرپتوکوک های دهانی بخصوص استرپتوکوکوس موتانس شده و از این راه خوردگی اسیدی مینای دندان کاهش می یابد زیرا تشکیل گلوکان برای اتصال باکتری ها به سطح هیدروکسی آپاتیت مینای دندان لازم است. کاهش تعداد استرپتوکوک های دهانی و عدم تشکیل بیوفیلم آنها بر سطح دندان، باعث تولید نشدن آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز و عدم ایجاد پلیمرهای گلوکان و لوان از سوکروز می گردد، یعنی خوردگی اسیدی مینای دندان در نتیجه عدم فعالیت وسیع این میکروارگانیسم ها حاصل نمی شود که نتیجه آن، عدم ایجاد پلاک های دندانی و پوسیدگی دندان است. آزمایشات Hamilton نیز نشان داد که برگ های خشک کاملیا سینسیس بخاطر وجود کاتچین های ساده اثر باکتری سایدی مستقیمی بر استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سورینوس دارند و از طرفی باعث مهار گلوکوزیل ترانسفراز این میکروارگانیسم ها می گردند (۳۱). Lim و همکارانش نیز عصاره های برگ گیاه چای را عامل بازدارنده رشد استرپتوکوکوس موتانس معرفی نمودند (۳۲)، مطالعات دیگری توسط Limsong و همکارانش نشان داد که عصاره های ۶ گونه گیاهی از جمله کاملیا سینسیس قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس به سطوح را کاهش می دهند (۳۳).

از بین باکتری های مورد آزمایش، مقاومت استرپتوکوکوس موتانس کمی بیشتر از سایر گونه ها بود و

بیشترین حساسیت را استرپتوکوکوس سنگوویس نسبت به هر کدام از عصاره های چای سیاه و سبز از خود نشان داد. تولید بیشتر پلیمرهای نامحلول گلوکان توسط گونه موتانس دلیل مقاومت بیشتر آن به نفوذ پذیری مواد موثر ضد میکربی موجود در عصاره ها نسبت به گونه های دیگر بود. همچنین مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که قدرت چسبیدن باکتری ها به یکدیگر هم در غلظت های بالای ۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره ها از بین رفته و این امر، عدم کلونیزاسیون باکتری ها را در پی دارد.

Okubo و همکاران نیز در سطح سلولی مشخص نمودند که عصاره های چای سیاه و سبز باعث ممانعت از فعالیت همولیتیک باکتری هایی که ایجاد همولیز می کنند، می گردد (۳۴) و همچنین از سنتز گلوکان های نامحلول نیز ممانعت می نماید (۳۵).

همانطور که ذکر گردید چای سرشار از فلاونول ها و کاتچین های مختلف می باشد که اینها مسئول قسمت اعظم خاصیت ضد میکربی چای می باشند. جدا کردن کاتچین های چای و مقایسه جداگانه آنها بر روی میکروارگانیسم های هدف باعث شناسایی موثرترین ترکیبات موجود در آن شده و کارآیی استفاده از مشتقات چای را جهت استفاده در تحقیقات فارماکولوژی چندین برابر می نماید.

### نتیجه گیری:

عصاره چای (*Camellia sinensis* L) بصورت چای سیاه و سبز در غلظت های کمتر از حد کشندگی، مانع از تشکیل بیوفیلم توسط *S. mutans*, *S. mitis* و *S. sanguis* می گردد و در غلظت های بالاتر دارای اثر باکتری سایدی روی این گونه ها می باشد. اثرات مهاری چای سیاه بیشتر از چای سبز بوده و قادرست در غلظت پایتتری تولید بیوفیلم استرپتوکوک های دهانی را مهار نماید که حاصل آن، عدم ایجاد پلاک های دندانی و پوسیدگی دندان است.

## تشکر و قدردانی:

جهت فراهم نمودن شرایط آزمایشگاه و مواد لازم برای این آزمایش، کمال سپاسگذاری را دارند.

نویسندگان این مقاله از زحمات ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، جناب آقای دکتر محمد اطیابی

## منابع:

1. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. Crit Rev Food Sci Nutr. 1997 Dec; 37(8): 693-704.
2. Koo MW, Cho CH. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. Eur J Pharmacol. 2004 Oct; 500(1-3): 177-85.
3. Feng Q, Kumagai T, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T, Uchida K. Anticarcinogenic antioxidants as inhibitors against intracellular oxidative stress. Free Radic Res. 2001 Dec; 35(6): 779-88.
4. Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). J Med Microbiol. 2001 Apr; 50(4): 299-302.
5. Yam TS, Shah S, Hamilton-Miller JM. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. FEMS Microbiol Lett. 1997 Jul; 152(1): 169-74.
6. Percival RS, Devine DA, Duggal MS, Chartron S, Marsh PD. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. Eur J Oral Sci. 2006 Aug; 114(4): 343-8.
7. Hara Y, Ishigami T. Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria. J Japanese Society Food Sci Technol. 1989; 36: 996-9.
8. Amarowicz R, Pegg BR, Bautista AD. Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K12. Nahrung. 2000 Feb; 44(1): 60-2.
9. Toda M, Okubo S, Ikigai H, Shimamura T. Antibacterial and anti-hemolysin activities of tea catechins and their structural relatives. [Article in Japanese] Nippon Saikingaku Zasshi. 1990 Mar; 45(2): 561-6.
10. Toda M, Okubo S, Ohnishi R, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. [Article in Japanese] Nippon Saikingaku Zasshi. 1989 Jul; 44(4): 669-72.
11. An BJ, Kwak JH, Son JH, Park JM, Lee JY, Jo C, et al. Biological and antimicrobial activity of irradiated green tea polyphenols. Food Chem J. 2004; 88(4): 549-55.
12. Horiuchi Y, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Protective activity of tea and catechins against *Bordetella pertussis*. [Article in Japanese] Kansenshogaku Zasshi. 1992 May; 66(5): 599-605.
13. Mbata TI, Debiao L, Saikia A. Antibacterial Activity Of The Crude Extract Of Chinese Green Tea (*Camellia Sinensis*) On *Listeria Monocytogenes*. Int J Microbiol. 2006; 2(2): 73-8.
14. Ahn YJ, Kawamura T, Kim M, Yamamoto T, Mitsuoka T. Tea polyphenols: selective growth inhibitors of *Clostridium spp.* Agri Biol Chem J. 1991; 55: 1425-6.
15. Sasaki H, Matsumoto M, Tanaka T, Maeda M, Nakai M, Hamada S. Antibacterial activity of polyphenol components in oolong tea extract against *Streptococcus mutans*. Caries Res. 2004 Jan-Feb; 38(1): 2-8.
16. Sudano Rocco A, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D, Enea V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jun; 48(6): 1968-73.

17. Ping SU, Henriksson A, Nilsson CH, Mitchell H. Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. World J Microbiol Biotechnol. 2008 Sep; 24(9): 1837-42.
18. Jawets A, Melnick J, Adelberg EA. Review of medical microbiology. A Lange Medical Book .17<sup>th</sup> ed. NewYork: Appelton & Lange; 1998. p: 212-14.
19. Accelerated Solvent Extraction (ASE). Sample preparation techniques for food and animal feed samples. Technical Note. 209, 2006. Dionex Corporation, Sunnyvale, CA: available at <http://dionex.com>
20. National Health Protection Agency. Susceptibility testing: national standard method. BSOP 2006; 2: 45-90.
21. Hsu SD, Singh BB, Lewis JB, Borke JL, Dickinson DP, Drake L, et al. Chemoprevention of oral cancer by green tea. Gen Dent. 2002 Mar-Apr; 50(2): 140-6.
22. Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1990 Mar; 38(3): 717-20.
23. Fukai A, Ishigami T, Hara Y. Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. Agri Biol Chem J. 1991; 55: 1895-7.
24. Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leave. J Agric Food Chem. 2003 Mar 26; 51(7): 1864-73.
25. Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. J Agri Food Chem. 1992; 40: 245-8.
26. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Prev Med. 1992 May; 21(3): 334-50.
27. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green Tea-A review. J Am Coll Nutr. 2006 Apr; 25(2): 79-99.
28. Brandao EH, Oliveira LD, Landucci LF, Ito CYK, Jorge AO. Antimicrobial activity of coffee-based solutions and their effects on *Streptococcus mutans* adherence. Braz J Oral Sci 2007; 6(20): 1274-7.
29. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. J Periodontal Res. 2002 Dec; 37(6): 433-8.
30. Toda M, Okubo S, Hara Y, Shinamura T. [Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Nippan Saikingaku Zasshi. 1991 Sep; 46(5): 839-45.] Japanese
31. Hamilton-Miller JMT. Anticariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). J Med Microbiol. 2001; 50: 299-302.
32. Lim SH, Seo JS, Yoon YJ, Kim KW, Yoo SY, Kim HS, et al. Effect of leaf-extract from camellia sinensis and seed-extract from casia tora on viability of mutans streptococci isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. Korean J Orthod. 2003; 33(5): 381-9.
33. Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchati J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. J Ethnopharmacol. 2004 Jun; 92(2-3): 281-9.
34. Okubo S, Ikigai H, Toda M, Shimamura T. The anti haemolysin activity of tea and coffee. Lett App Microbiol. 1989; 9: 65-6.
35. Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo E, et al. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal adsorption of Cholesterol in rats. Biochimica Biophysica Acta. 1992 Jul; 1127(2): 141-6.